

深海多环芳烃降解菌新鞘氨醇杆菌 H25 的降解特性及降解基因

袁军^{1,2}, 赖其良², 郑天凌¹, 邵宗泽^{2*}

(¹ 厦门大学生命科学院, 厦门 361005)

(² 国家海洋局第三海洋研究所, 海洋生物遗传重点实验室, 厦门 361005)

摘要:【目的】为了从深海环境中筛选新的多环芳烃降解菌, 了解其降解基因及降解特性。【方法】以原油作为碳源从印度洋深海海水样品中富集筛选出降解能力较强的多环芳烃降解菌, 并根据已报道的相关菌属的多环芳烃起始双加氧酶大亚基序列及侧翼序列设计兼并引物进行扩增。【结果】获得了 1 株能够高效降解原油、柴油及多种多环芳烃的菌株 H25。经 16S rDNA 序列系统发育分析表明它属于新鞘氨醇杆菌属 (*Novosphingobium*) (96%)。并从该菌株中扩增获得 2 条相似度为 91.0% 双加氧酶基因片段。2 条序列在 NCBI 上 Blastn 分析表明均与菌株 *N. aromaticivorans* DSM12444^T 的降解质粒 pNL1 上的双加氧酶大亚基具有最高相似度, 分别为 99.6% 和 91.0%。根据 pNL1 上的双加氧酶序列设计引物获得了包含 H25 双加氧酶大亚基及上下游序列的 2 个基因片段 H25₁ (2.9kb) 和 H25₂ (4.5kb)。另外, 单碳降解实验表明 H25 对联苯、2-甲基萘、2, 6-二甲基萘、菲、二苯并噻吩、二苯并呋喃等均有较好的降解能力。【结论】H25 菌株是 *Novosphingobium* 属可能的新种。深海细菌在大洋环境多环芳烃污染的自然净化中起到一定作用, 并在环境生物修复中有较大的应用前景。

关键词: 深海; 新鞘氨醇杆菌; 多环芳烃; 降解; 双加氧酶

中图分类号: R939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1208-06

多环芳烃 (PAHs) 是一类广泛分布于环境中的含有 2 个苯环以上的有毒有害污染物, 主要来源于人类活动和能源利用过程^[1]。由于多环芳烃的潜在毒性、致癌性及致畸诱变作用, 通过生物累积及食物链传递, 给生物体、生态环境和人体健康带来极大危害, 已引起各国环境科学家的极大重视^[2]。研究表明, 微生物降解在该污染物的迁移转化乃至最终从环境中消失的过程中占有重要的地位, 是环境中多环芳烃去除最主要的途径^[3]。而海洋环境蕴藏着众多目前不为人类所知的微生物, 它们具有数量巨大, 代谢类型多样和适应突变能力强等特点, 是海洋污染环境生物修复的主体, 任何存在污染物的地方都会出现相应的降解微生物, 并存在着或强或弱的生物降解作用^[4]。占地

球表面 60% 的深海中, 大量微生物的作用更不为人知。本文利用原油富集培养后进行 PAHs 降解菌的筛选, 从 2005 年“大洋一号”科考船采集的深海海水样品中分离筛选到 1 株能够降解多种 PAHs 的新鞘氨醇杆菌属细菌 H25, 并对其相关降解基因进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: 印度洋深海海水样: 站点 IR-CTD5: 124°58.2958' (E), 16°59.9412' (N), 深度为 4746 m, 为 2005 年“大洋一号”环球科考 CTD 采样器所采。

1.1.2 培养基: NH 培养基: 每升天然陈海水中加入 1.0 g NH₄NO₃, 1.0 g KH₂PO₄, 调 pH 至 7.6, 高

基金项目: 国家“973 项目”——重点基础研究发展规划项目(2004CB719601); 国家自然科学基金(36100501; 40376041); 国家自然科技资源共享平台建设项目(2005DKA21209)

*通讯作者: Tel: +86-592-2195321; Fax: +86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

作者简介: 袁军(1979-), 女, 重庆人, 博士研究生, 主要从事资源与环境微生物研究。E-mail: yjmail2008@126.com

压灭菌后加入终浓度为 2.8 mg/L 的 FeSO_4 。216L 固体培养基:每升天然海水中含 1.0 g NH_4NO_3 , 1.0 g 无水乙酸钠, 0.5 g 柠檬酸钠, 0.5 g 普通肉汤培养基, 2.0 g 酵母提取物, 10.0 g 胰蛋白胨, 0.2 g 葡萄糖, 15.0 g 琼脂, pH 7.5。

1.1.3 主要试剂和仪器:2,6-二甲基萘(含量 98%)、菲(含量 >97%)、蒎(含量 >96%)、屈(含量 90%)、芘(含量 95%)、苊(含量 98%)、荧蒎(含量 98.5%)、二苯并噻吩(含量 98%)、苯并苊(含量 96%)、二苯并呋喃(含量 99%)购自 Sigma 公司;2-甲基萘(含量 97%)、芴(含量 >98%)购自 Alfa Aesar 公司;联苯(含量 99.8%)、萘(含量 99.8%)购自中国医药集团上海化学试剂公司;三氯甲烷(色谱纯)购自上海化学试剂研究所;PCR 相关试剂由 TaKaRa 提供;恒温摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司);Alpha Innotech 凝胶成像仪(San Leandro, California);GCMS-QP2010 型气质联用仪(日本岛津公司);PCR 扩增仪(Eppendorf)。

1.2 原油富集与 PAHs 降解菌的筛选

取 250 mL 灭菌的三角瓶于超净台中加入 100 mL 海水水样,补加灭菌的 NH_4NO_3 和 KH_2PO_4 浓缩液至终浓度为 0.1% (W/V),添加过滤除菌的 FeSO_4 溶液至终浓度为 2.8 mg/L,最后再加 1% (V/V) 原油作为碳源和能源进行富集培养。在摇床上 28℃, 160 r/min 避光培养 7 d 后,取 2 mL 培养液转入 100 mL 新鲜的 NH 培养基中,共转接 5 次。将最终的富集物梯度稀释、涂布 216L 平板,分离单菌。得到的培养物接种到含有混合 PAHs 的 NH 培养基上验证其是否为多环芳烃降解菌。培养物变混浊或产生颜色的被初步认定为降解菌。单菌降解功能验证培养基中混合 PAHs 组成为菲 100 mg/L、苊 10 mg/L、荧蒎 10 mg/L、蒎 10 mg/L。

1.3 16S rDNA 克隆、鉴定

细菌的 DNA 提取方法参照文献[5]。16S rDNA 的扩增及测序参考文献[6]。测序结果在 NCBI 进行 BLAST 分析并用 DNAMAN6.0 和 MEGA4.0 软件以邻位相连(Neighbor joining)法构建系统进化树。

1.4 PAH 降解范围及降解率测定

取对数生长期的 H25 培养物 1 mL 离心并用灭菌的 NH 培养基洗涤 3 遍,然后接种到含有单一 PAH 物的 NH 培养基中。在 28℃、180 r/min、避光培养 15 d,测定其对各种 PAHs 的降解能力。测定的 PAHs

包括:300 mg/L 的联苯、萘、2-甲基萘、2,6-二甲基萘和菲;50 mg/L 的蒎、芴、屈、芘、苊、荧蒎、二苯并噻吩、苯并苊和二苯并呋喃。采用 GC-MS 测定培养基中残留的 PAHs 量。每次测定均设 3 个平行,并设不接种及不加 PAH 的 2 个空白对照。

1.5 双加氧酶大亚基的扩增

根据已经报道的新鞘氨醇杆菌属 PAHs 起始双加氧酶大亚基基因序列设计了一对简并引物:dioxF(5'-TGCAATTATCAYGGYTGG-3');dioxR(5'-GGTATA-SCTSAKACCTC-3')。PCR 程序:94℃ 4 min;94℃ 1 min,52℃ 30 s,72℃ 1 min,循环 35 次;72℃ 8 min。PCR 产物的大小约 700 bp。将基因片段克隆测序,测序结果在 NCBI 进行 BLAST 分析。根据比对结果进一步设计引物,进行套式 PCR 扩增大亚基两侧序列。将获得的双加氧酶大小亚基序列分别构建系统发育树,方法同上所述。

2 结果

2.1 PAH 降解菌的初步筛选

培养 15 d 后,发现接种 H25 的验证培养基由无色透明变为棕褐色浑浊。表明培养基中有菌体生长并且有 PAHs 的代谢产物产生,H25 菌株初步认定为 PAHs 降解菌。

2.2 菌株 16S rDNA 分析

扩增菌株 H25 的 16S rDNA 基因,测序后进行同源性分析。结果表明,该菌株与新鞘氨醇杆菌属的 *Novosphingobium pentaromativorans* US6-1^T 和 *Novosphingobium subarcticum* JCM 10398^T 亲缘关系最近,但 16S rDNA 基因相似性仅为 96.0%和 95.7%。它与该属其它种模式菌株的相似度为 94.0%到 94.9%。可能是该属的一个新种。新鞘氨醇杆菌属是由以前的鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*)划分出来的一个新属。该属在水体中分布广泛,并且大多数都与有毒化合物的降解有关。其中 *N. pentaromativorans* US6-1^T 是 1 株分离自河口沉积物的高环 PAHs 降解菌^[7],而 *N. subarcticum* JCM 10398^T 是 1 株能够降解氯酚的芳烃降解菌^[8]。

2.3 PAHs 降解率测定

将 H25 在含有单种 PAH 的 NH 培养基中培养 15 d 后测定了其对各种 PAH 的降解能力。降解率测定结果表明,菌株 H25 对联苯、2-甲基萘、2,6-二甲基萘、菲、二苯并噻吩、二苯并呋喃和苊具有较强

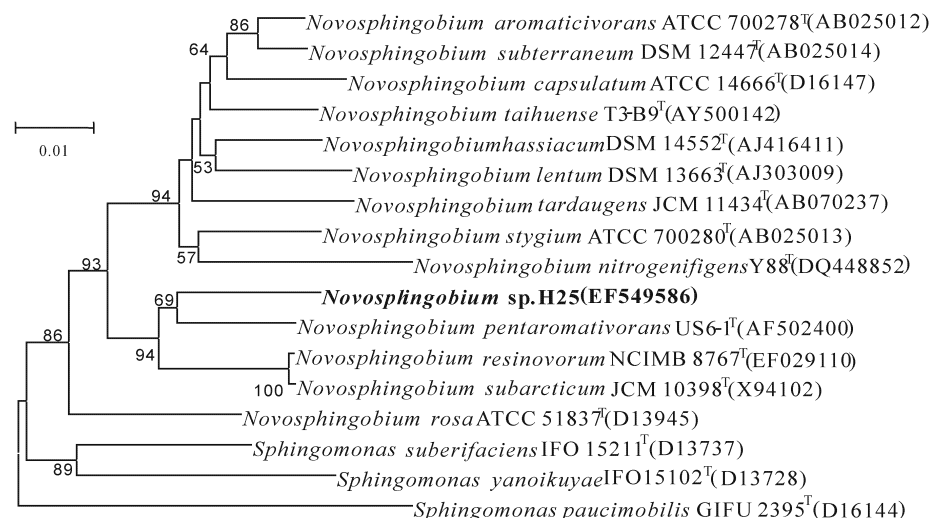


图1 基于16SrDNA序列的*Novosphingobium* sp. H25菌株系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on nearly complete 16S rDNA gene sequence showing relationships between strain H25, *Novosphingobium* species and some other members of the Sphingomonadaceae. The numbers in brackets are accession numbers. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1000 resampled data sets; only values above 50% are given. The scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position.

的降解能力,降解率分别为 95.6%、82.0%、91.2%、91.0%、87.0%、89.1%和 90.7%,而对萘、茚、4-甲基二苯并噻吩及难降解的蒽也有较好的降解效果,降解率分别为 58.4%、63.8%、61.5%、38.1%。此外,在摇瓶中虽然没有观察到明显生长,但 GC-MS 分析发现 H25 对较难降解的屈及茱萸也有微弱的降解作用,降解率分别为 29.7%和 6.1%。在该培养条件下 H25 菌株不降解萘和苯并茱萸。

2.4 双加氧酶序列的比对分析

用简并引物进行 PCR 扩增及连接转化后,克隆子酶切分析并测序发现 H25 含有 2 个相似度为 91.0%的双加氧酶基因片段,经 NCBI 比对发现均与 *N. aromaticivorans* DSM12444^T 所含质粒 pNL1 上编码双加氧酶大亚基的 *bphA1f* 基因具最高相似度,分别为 99.6%和 91.0%。由 2 个基因片断的蛋白序列比对推断它们是芳烃开环所需的双加氧酶基因的大亚基。

根据质粒 pNL1 上 *bphA1f* 基因的上下游序列设计引物扩增获得了菌株 H25 的 2 个双加氧酶基因片段的上下游序列,总长分别为 2.9 kb (H25⁻) 和 4.5 kb (H25⁺)。如图 2 所示, H25⁻ 序列含有 3 个 ORF, 其中 ORF1 与质粒 pNL1 上的乙醇脱氢酶核苷酸序列全长差 72 bp, 已获得序列的相似度为 97.6%。ORF2 为完整的阅读框,由 174 个氨基酸组成,与 pNL1 上的双加氧酶小亚基核苷酸序列相似度为 96.8%,氨基酸水平上有 97.7%的同源性。ORF3 由 459 个氨基酸

组成,与 pNL1 上的双加氧酶大亚基核苷酸序列相似度为 92.3%,氨基酸水平上有 96.5%的同源性。H25⁺ 包含有 4 个 ORFs, 其中前 3 个 ORF 与 H25⁻ 排列和组成相似,但同源性有所不同,与 pNL1 上的乙醇脱氢酶、双加氧酶大小亚基在氨基酸水平的同源性分别为 98.0%、99.1%、97.7%。与 H25⁻ 的双加氧酶大小亚基相似度分别为: 96.5%与 98.8%。第 4 个 ORF 未获得全长,与它相似度最高的蛋白是 pNL1 上功能未知的蛋白。双加氧酶是多环芳烃降解的关键酶之一,其所含的大小亚基共同影响底物特异性^[9]。



图2 H25⁻与 H25⁺中所含开放阅读框的排布

Fig. 2 The arrangement of ORFs in H25⁻ and H25⁺.

因此,从 NCBI 下载具有代表性细菌的双加氧酶大小亚基序列,分别构建了系统进化树,如图 3 和图 4 所示, H25⁻ 和 H25⁺ 的双加氧酶大亚基和 *N. aromaticivorans* DSM12444^T 质粒 pNL1 上的双加氧酶具有最近的进化距离;其次是来自 *Sphingomonas* sp. LH128 的 *nahA1f* 基因,氨基酸序列相似度为 98.9%和 95.9%;再其次是来自 *Novosphingobium* sp. phe-8 的环羟化双加氧酶大亚基,为 98.3%和 93.0%;再次

是来自 *Sphingobium yanoikuyae* B1 上的 *bphA1f* 基因, 为 79.1% 和 78.6%。H25 和 H25 的双加氧酶小亚基也和 pNL1 的双加氧酶小亚基具有最高相似度, 其次

是来自 *Sphingomonas* sp. LH128 的 *nahA2f* 基因, 氨基酸序列相似度为 96.5% 和 97.1% ; 再次是来自 *Sphingomonas* sp. CHY-1 的 *phnA2a* 基因, 为 69.5% 和 69.0%。

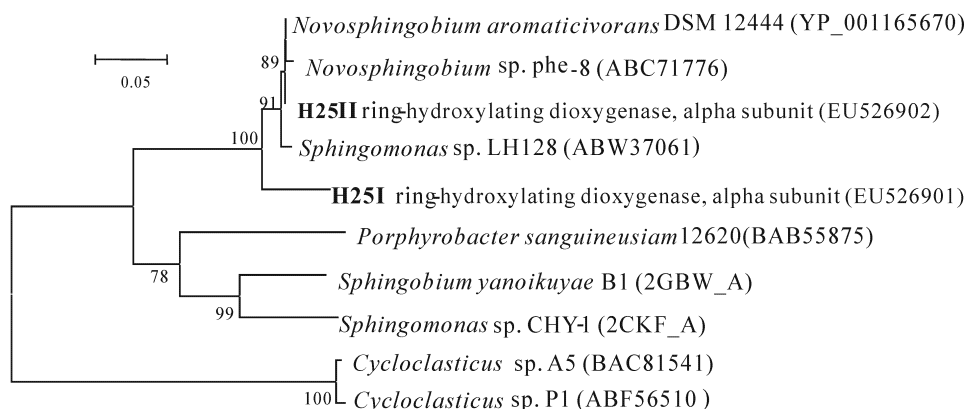


图 3 H25PAHs 双加氧酶大亚基氨基酸序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of ring-hydroxylating dioxygenase, alpha subunit of *Novosphingobium* sp. H25. The numbers in brackets are accession numbers. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1000 resampled data sets; only values above 50% are given. The scale bar corresponds to 0.05 substitutions per nucleotide position.

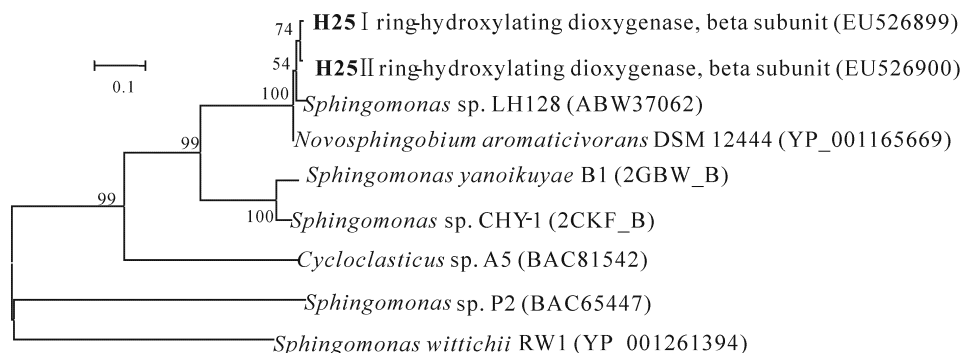


图 4 H25PAHs 双加氧酶小亚基氨基酸序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of ring-hydroxylating dioxygenase, beta subunit of *Novosphingobium* sp. H25. The numbers in brackets are accession numbers. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1000 resampled data sets; only values above 50% are given. The scale bar corresponds to 0.1 substitutions per nucleotide position.

3 讨论

许多 PAHs 降解菌已经从受污染土壤和水体中得到分离^[10], 但是深海来源的 PAHs 降解菌株的分离和降解特性的研究却鲜有报道^[11,12]。本研究从印度洋深海水样中分离获得了一株具有 PAHs 降解功能的菌株。为了了解该菌株在海洋环境中对 PAHs 的降解能力, 降解试验采用的培养基为天然海水添加少量营养元素。试验结果证明在该培养条件下 H25 菌株能利用多种 PAHs。

菌株 H25 在 16S rDNA 序列上与 *N.*

pentaromativorans US6-1^T 最为接近, 但是该菌未见其有关降解基因方面的报道。菌株 H25 中扩增到的 2 个双加氧酶基因序列均与 *N. aromaticivorans* DSM12444 的质粒 pNL1 上的双加氧酶最为接近, 相似度高达 98%, 而它们之间的系统进化关系则较远, 16S rDNA 的相似度仅为 94.3%。另外, H25 与同属的 phe-8 菌株及 *Sphingobium* 属的菌株所含双加氧酶相似度也较高。这 2 个属与 *Novosphingobium* 属亲缘关系较为接近, 以前一直被视为 *Sphingomonas* 属, 直到 2001 年被 Takeuchi 具体划分成 4 个不同的属^[13]。说明 *Novosphingobium* 属与 16S rDNA 进化关系较近

的属所含芳烃降解基因均较相似。

综上,从 H25 菌株对 PAHs 的利用情况及扩增到的加氧酶片断与已知基因的高度相似性可以初步判定该基因为 PAHs 降解途径中的关键酶。*Novosphingobium* 是 1 个包含众多 PAHs 降解菌的重要属,从对比结果来看,该属不同种之间芳烃降解的关键酶具有较高的相似性,菌株 DSM12444 和 phe-8 的双加氧基因已经发现是位于其降解质粒上^[14],而且有实验证明该属菌株间存在频率较高的质粒转移^[15]。但是,这些含有相似降解基因的菌株在降解 PAHs 时却表现出不同的降解特性,如菌株 H25 能降解联苯、萘、2-甲基萘、2,6-二甲基萘、菲、二苯并噻吩、二苯并呋喃、芘、4-甲基二苯并噻吩和蒽等,而不能降解芘和苯并芘;菌株 DSM12444 则不能利用菲等高环 PAHs^[16]。产生这些差异的原因可能是它们所含降解基因的功能不完全相同或有辅助降解的其他酶系。菌株 DSM12444 的质粒 pNL1 上已经发现共含有 6 个与环裂解相关的不同的双加氧酶 α 大亚基和 7 个 β 小亚基^[16]。本文也在菌株 H25 中发现了 2 个不同的双加氧酶基因,两者间的氨基酸序列差异可能导致其底物催化范围不同,这一点有待通过基因功能的表达来进一步验证。

H25 是 1 株来自印度洋深海的降解菌,含有至少 2 套与芳烃降解有关的双加氧酶系统,能较好的利用多种 PAHs。这说明在研究不多的未受污染的深海区域蕴藏着许多具有清除有机污染物功能的菌种,是值得进一步探索和研究的新领域。

参 考 文 献

- [1] Baird C. Environmental Chemistry. New York: W.H. Freeman and Company Press, 1995, pp276–278.
- [2] 高学晟, 姜霞, 区自清. 多环芳烃在土壤中的行为. 应用生态学报 (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 2002, 13(4): 501–504.
- [3] Gibson DT, Mahadevan V, Jerina RM, *et al.* Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*, 1975, 189: 295–297.
- [4] 薛超波, 王国良, 金珊, 等. 海洋微生物多样性研究进展. 海洋科学进展 (*Advances in Marine Science*), 2004, 22(3): 378–386.
- [5] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998, pp13–50.
- [6] 邵宗泽, 许晔, 马迎飞, 等. 一株海洋石油降解细菌的降解能力. 环境科学 (*Environmental Science*), 2005, 25 (5): 133–137.
- [7] Sohn JH, Kwon KK, Kang JH, *et al.* *Novosphingobium pentaromaticivorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment. *IJSEM*, 2004, 54: 1483–1487.
- [8] Nohynek LJ, Nurmiaho-Lassila EL, Suhonen EL, *et al.* Description of chlorophenol-degrading *Pseudomonas* sp. strains KF1T, KF3, and NKF1 as a new species of the genus *Sphingomonas*, *Sphingomonas subarctica* sp. nov. *IJSB*, 1996, 46: 1042–1055.
- [9] 孙艳, 钱世钧. 芳香族化合物生物降解的研究进展. 生物工程进展 (*Progress in Biotechnology*), 2001, 21(1): 42–46.
- [10] 温洪宇, 廖银章, 李旭东. 微生物降解多环芳烃的研究进展. 微生物学杂志 (*Journal of Microbiology*), 2005, 25(6): 73–75.
- [11] Wang BJ, Lai QL, Cui ZS, *et al.* A pyrene-degrading consortium from deep-sea sediment of the west pacific and its key member *Cycloclasticus* sp. P1. *Environ Microbiol*, 2008, 10(8): 1948–1963.
- [12] Cui Z, Lai Q, Dong C, *et al.* 2008. Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon- degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environ Microbiol*, 2008, 10(8): 2138–2149.
- [13] Takeuchi M, Hamana K, Hiraishi A. Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *IJSEM*, 2001, 51: 1405–1417.
- [14] 崔志松, 邵宗泽. 一株海洋新鞘氨醇杆菌 phe-8 (*Novosphingobium* sp.) 的 PAHs 降解基因和降解特性. 厦门大学学报 (*Journal of Xiamen University*), 2006, 45(sup): 257–261.
- [15] BastaT, Keck A, Klein J, *et al.* Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotic-degrading *Sphingomonas* strains. *J Bacteriol*, 2004, 186 (12): 3862–3872.
- [16] Romine MF, Stillwell LC, Saffer JD. Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199. *J Bacteriol*, 1999, 181: 1585–1602.

Polycyclic aromatic hydrocarbon -degrading bacterium *Novosphingobium* sp. H25 isolated from deep sea and its degrading genes

Jun Yuan^{1, 2}, Qiliang Lai², Tianling Zheng¹, Zongze Shao^{2*}

(¹School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

(²Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, the Third Institute of Oceanography, State of Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to isolate novel and efficient polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading bacteria from deep sea. **[Methods]** Bacteria in deep-sea water sample from Indian Ocean were enriched in the medium with crude oil as the carbon source. PAH-degrading bacteria were isolated and their degradation potential was tested by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. PCR-primers were designed to detect the gene encoding the large subunit of aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase. **[Results]** A PAHs-degrading bacterium, named H25 was obtained. Several PAHs including 2-methynaphthalene, 2, 6-dimethynaphthalene, phenanthrene and dibenzothiophene and dibenzofuran could be used as carbon sources for growth by strain H25. Analysis of 16S rDNA sequence showed that it belonged to genus *Novosphingobium* with highest similarity (96%) with previously described bacteria. Two fragments of the dioxygenase gene were obtained by PCR with size of about 700bp, which were closest to the counterpart of *N. aromaticivorans* DSM12444 with 99.6% and 91.0% similarities. Furthermore, two fragments named H25I (2.9 kb) and H25II(4.5kb) containing the upstream and downstream sequences were obtained by another set of primers. **[Conclusion]** Strain H25 was a novel PAH-degrading bacterium in deep sea environment, which might play a role in bioattenuation of PAH in oceanic environments and has potential in bioremediation of PAH contaminated environment.

Keywords: Deep sea; *Novosphingobium*; Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); Dioxygenase; Biodegradation

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Foundational Research and Development of China (2004CB719601), the National Natural Science Foundation of China (36100501; 40376041) and the National Infrastructure of Natural Resources for Science and Technology Program of China (2005DKA21209)

*Corresponding author. Tel: +86-592-2195321; Fax: +86-592-2085376; E-mail: shaozz@163.com

Received: 6 March 2008/ Revised: 4 May 2008

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问: 贵刊的审稿程序是怎样的? 一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答: 我们的承诺是争取在 2 个月之内给予答复, 5~7 个月之内刊出。

- (1) 收到来稿后, 首先将请 2 位专家进行初审, 再送主编进行最后的总审, 这个过程一般不会超过 2 个月。如果初审的 2 位专家的意见分歧较大, 编辑部将再请第 3 位专家进行初审, 之后再送主编总审, 那么此稿的审理时间可能会超过 2 个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见), 编辑会给作者发出 e-mail 告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的), 作者在返回修改稿后经本刊审核合格后方可被录用。在此提醒作者不要在远程系统中看到初审意见时就急于修改稿件。

问: 如我的投稿没有被贵刊录用, 是否告知退稿原因? 对退稿有异议怎么办?

答: 本着对每一篇投稿负责的原则, 本刊一贯遵循三审制的制度, 即: 编辑部内审、专家初审、主编总审。所以无论录用和退稿, 都会给作者一份比较全面的审稿意见。

- (1) 对于每一篇退稿, 我们都会详细写明退稿原因, 为您进一步修改论文提供帮助。
- (2) 如您对退稿意见有异议, 可以给我们写信表明看法, 我刊将请专家予以复审。

问: 我可否指定审稿人, 或言明请某审稿人回避?

答: 您在投稿时可以附上您推荐的审稿人名单, 或请予回避的审稿人名单, 供编辑部参考, 但编辑部是否采纳将视具体情况而定。